

4/7/5

DIALOG(R)File 352:Derwent

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008465835

WPI Acc No: 1990-352835/199047

New 115-unit polypeptide and DNA encoding it - is anticoagulant and anti-platelet aggregation agent

Patent Assignee: ASAHI CHEM IND CO LTD (ASAHI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2255699	A	19901016	JP 8974009	A	19890328	199047 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8974009 A 19890328

Abstract (Basic): JP 2255699 A

The following are claimed (A) peptide having or specified amino acid sequence of formula (I). (B) deoxyribo nucleic acid (DNA) encoding (I). (C) a DNA having a specified base sequence of formula (II). (D) a replicable recombinant DNA comprising DNA (II) and an expression vector. (E) microorganism or cell transformed by recombinant DNA. (F) preparation of peptide of formula (I). (G) medical compound containing (I) which has anticoagulant action as a result of combining with thrombin.

USE ADVANTAGE - the peptide of formula (I) is highly effective in the treatment of circulatory organ diseases and gestosis. It has anticoagulant and anti-platelet aggregation action as well as thrombus dissolution. Used as to prevent the formation of thrombi by combining with artificial medical materials such as artificial blood vessels, internal organs and catheters.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-013/00; C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-015/12; C12P-021/02

平2-255699

⑫ 公開特許公報 (A)

⑬ Int. Cl. 5

C 07 K 13/00
 A 61 K 37/02
 C 12 N 1/21
 5/10
 15/12
 15/70
 15/85
 C 12 P 21/02

識別記号

Z N A
 A C B

序内整理番号

8619-4H
 8615-4C
 8515-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)10月16日

C

8214-4B
 8717-4B
 8515-4B

C 12 N 15/00
 5/00

A
 B※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全19頁)

⑮ 発明の名称 新規血液抗凝固物質及びその製法

⑯ 特 願 平1-74009

⑰ 出 願 平1(1989)3月28日

⑱ 発明者 山本 修司 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

⑲ 発明者 鈴木 宏治 三重県津市鳥居町191番地2

⑳ 出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

㉑ 代理人 弁理士 萩上 豊規

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

新規血液抗凝固物質及びその製法

2. 特許請求の範囲

(1) 次式 (I) :

Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu
 Tyr Glu Cys Glu Pro Leu Asn Glu Thr Ser
 Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
 Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Glu
 Met Phe Cys Asn Glu Thr Ala Cys Pro Ala
 Asp Cys Asp Pro Asn Thr Glu Ala Ser Cys
 Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp
 Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys
 Glu Asn Glu Gly Phe Cys Ser Glu Val Cys
 His Asn Leu Pro Glu Thr Phe Glu Cys Ile
 Cys Glu Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His
 Ile Glu Thr Asp Cys ... (I)

で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド。
 (2) 遺伝暗号の縮合に基づき少なくとも1個の塩基が置換されている又は置換されていない請求

項1記載のペプチドをコードするデオキシリボ核酸。

(3) 遺伝暗号の縮合に基づき少なくとも1個の塩基が置換されている又は置換されていない次式 (II) :

GTGGACCCGT GCTTCAGAGC CAACTGGAG TACCACTGCC
 AGCCCCCTGAA CCAAACCTAGC TACCTCTGCCG TCTGCCGCCA
 GGGCTTCCCG CCCATTCCCC ACGAGCCGCA CAGGTGCCAG
 ATGTTTTCCA ACCAGACTGC CTGTCCAGCC GACTGCCGACC
 CCAACACCCA GGCTAGCTGT GAGTGCCCTG AAGGCTACAT
 CCTGGACGAC GGTTCATCT GCACGGACAT CGACGAGTGC
 GAAAAACGGCG GCCTCTGCTC CGGGGCTGTC CACAACCTCC
 CCGGTACCTT CGAGTGCATC TGCGGGCCCG ACTCGGCCCT
 TGTCCGCCAC ATTGGCACCCG ACTGT ... (II)

で表わされる塩基配列を含有する請求項2記載のデオキシリボ核酸。

(4) 請求項2記載のデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNA。

(5) 請求項3記載の複製可能な組換えDNAで

形質転換された微生物または細胞。

- (b) (a) 請求項1記載のペプチドをコードする塩基配列を含有するデオキシリボ核酸を複製可能な発現ベクターに結合して該デオキシリボ核酸と該複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換え体DNAを得、
- (b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物又は細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、
- (c) 該形質転換体を該微生物または細胞の親細胞から選別し、
- (d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該デオキシリボ核酸を発現させて、該ペプチドを産生せしめ、そして
- (e) 該ペプチドを培養した形質転換体から単離することを含む請求項1記載のペプチドの製造方法
- (f) トロンビンと結合してトロンビンの持つ血液凝固の作用を血液抗凝固作用へと変換させるために有効な量の請求項1記載のペプチド及び少

なくとも1種の薬剤として投与可能な担体、希釈液または試形剤を含有する医薬組成物。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はトロンビンと結合してトロンビンの持つ血液凝固の作用を血液抗凝固作用へと変換させる作用を有するペプチドに関する。更に詳しくは、血栓溶解作用、抗血液凝固作用及び血小板凝集抑制作用を有し、循環器系の疾患の治療に有用なペプチドに関する。本発明は、また、その新規なペプチドをコードするデオキシリボ核酸（以下“DNA”と称する）、該DNAを含有する複製可能な組換え体DNA、該組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞及び組換えDNA技術による該ペプチドの製造方法に関する。

本明細書において、アミノ酸及びペプチドは下記に示すIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)で採用された略号を用いて表される。なお、アミノ酸などに表し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。更に、特

に明示しない限りペプチドのアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれN末端及びC末端である。

Gln: グルタミン残基

Asp: アスパラギン酸残基

Pro: プロリン残基

Tyr: チロシン残基

Val: バリン残基

Lys: リジン残基

Glu: グルタミン酸残基

Ala: アラニン残基

Asn: アスパラギン残基

Leu: ロイシン残基

Phe: フェニルアラニン残基

Gly: グリシン残基

His: ヒスチジン残基

Ser: セリン残基

Thr: スレオニン残基

Ile: イソロイシン残基

Trp: トリプトファン残基

Arg: アルギニン残基

Met: メチオニン残基

Cys: システイン残基

また、ポリデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴスクレオチドは下記の如き略号で表されるデオキシリボヌクレオチドの配列により表記する。

A: 2'-デオキシアデニル酸残基

C: 2'-デオキシシチジル酸残基

G: 2'-デオキシグアニル酸残基

T: チミジル酸残基

特にことわらない限り、デオキシリボヌクレオチド配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

(従来の技術)

現在、血栓溶解剤として用いられるものには、ストレプトキナーゼやウロキナーゼがある。また、抗血液凝固剤としてはヘパリンやワーフアリンが用いられている。さらに、血小板凝集抑制剤としてはアスピリン、スルフィンピラゾン、ジビリグモール等が使われている。

現在これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および

血小板凝集抑制剤、それぞれ別個に、あるいは併用して、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(D I C)、狭心症、一過性脳虚血发作、妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いられている。しかしながら、これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は非常に複雑な機構から成り立つ血液の凝固線溶系の僅く一部に作用するにすぎない。そこで、血液の凝固線溶系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を示す薬剤が求められていた。

ところで、血液凝固機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質としてプロテインCが知られている。近年、そのプロテインCの活性化を促進し、トロンビンの作用による血小板の活性化とフィブリリン形成を抑制する物質が、ウサギの肺、ウシの肺、ヒトの肺やヒト胎盤などに存在し、それが前述の薬剤に比べて優れた血液凝固抑制作用を有することが報告されている。ウサギ肺に存在する物質については、例えば、シーオブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、259巻、12246頁(1984年)；エス・クロサワ(S. Kurokawa)ら、トロンボシス・リサーチ(Thrombosis Research)、37巻、353頁(1985年)を参照することができる。また、ヒト肺に存在する物質については、例えば橋本ら、生化学、57巻、1102頁(1985年)を参照することができる。

上記の先行技術文献には上記物質の一般的な性質が記載されている。しかしながら、その物質の構造、例えばアミノ酸配列などは解明されておらず、未だにその物質は同定されていない。従って、上記の先行技術文献に報告されている物質が单一物質であるか否か、また、これらの先行技術文献の記載にしたがって同一の物質が繰返し得られるか否かについては全く不明である。

最近、本発明者らによって、上記物質の遺伝子が単離され(鈴木ら、ザ・エンボ・ジャーナル(The EMBO Journal)、6巻、1891頁(1987年)、白井ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biol.

Chem.)、103巻、281頁(1988年)等)、さらに遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて上記物質の構造と機能に解析が加えられ、118アミノ酸残基からなるペプチドにトロンビンによるプロテインCの活性化能を促進する作用があることが示されている。(国際公開番号WO88/05053(国際出願番号PCT/JP88/00011))

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者等は、上述の技術的背景にあって、血液の凝固線溶系の一因子であるプロテインCを活性化して血液凝固を抑制するだけでなく、線溶作用を増進する新たな物質を見出すべく鋭意研究を重ねた結果、後述するように特定のアミノ酸配列を有するペプチドが、トロンビンによるプロテインC活性化を促進して血液凝固を抑制することができるだけでなく、線溶を促進することができ、血液凝固を抑制する薬剤として有用であることを見出した。更にまた、そのペプチドが、組換えDNA技術によって大量にかつ容易に製造できることを見出した。本発明は、これら知見に基づいて

て完成した。即ち、本発明の目的はトロンビンと結合してトロンビンの持つ血液凝固の作用を血液抗凝固作用へと変換させる作用を有するペプチドを提供することにある。

また、本発明の別の目的は、上記ペプチドをコードするDNAを提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、該ペプチドをコードするDNAを含有する複製可能な組換えDNAを提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、上述のような組換えDNAを形質転換された微生物または細胞を提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、上述のようなペプチドの製造方法を提供することにある。

(問題を解決するための手段)

即ち、本質的には、本発明によれば、次式(1):

Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu
Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser
Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln

Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala
Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys
Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp
Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys
Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys
His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile
Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His
Ile Gly Thr Asp Cys ... (1)

で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンと結合してトロンビンの持つ血液凝固の作用を血液抗凝固作用へと変換させる作用を有するペプチドが提供される。

本発明のペプチドは実質的に前記式(1)で表されるアミノ酸配列から成っていてもよいし、また、式(1)で表されるアミノ酸配列と、そのN末端及び/またはC末端に結合した少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を更に含有してもよい。

さらに、自然の変異によりまたは人工の変異により、ペプチドの活性に重大な変化を与えること

なく、ペプチドの構造の一部を変化させることができあるから本発明のペプチドは、前記アミノ酸配列を有するペプチドの相同変異体(Homologous variant)に相当する構造を有するペプチドも包含する。

本発明のペプチドは少なくとも1個の糖残基を含有していてもよいし、含有していないなくてもよい。

また、本発明によれば遺伝暗号の縮重に基づき少なくとも1個の塩基が置換されている又は置換されていない前記式(1)で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするデオキシリボ核酸が提供される。

上記デオキシリボ核酸の1つの態様として、遺伝暗号の縮重に基づき少なくとも1個の塩基が置換されているまたは置換されていない次式(2):

GTGGACCCGT GCTTCAGACC CAACTGCCAG TACCACTGCC
AGCCCTGAA CCAAACTAGC TACCTCTGCC TCTGCCGCCAG
GGGCTTCGCG CCCATTCCCC ACCGAGCCGCA CAGGTGCCAG
ATGTTTGCA ACCAGACTGC CTGTCCAGCC GACTGCCACC
CCAACACCCA GGCTAGCTGT GAGTCCCCCTG AAGGCTACAT

CCTGGACCGAC CGTTTCATCT GCACGGACAT CGACCGAGTGC
GAAAAACCGCG GCTTCTGCC CCGGGGTGTGC CACAACCTCC
CCGGTACCTT CGAGTGCATC TGCGGGGCCCG ACTCGGCCCT
TGTCCGGCAC ATTGGCACCG ACTGT ... (2)

で表される塩基配列を含有するデオキシリボ核酸が提供される。

本発明のDNAは前記式(2)で表される塩基配列と、その5'末端および/または3'末端に結合した少なくとも1種の他の塩基配列とを含有していてもよい。

本発明によれば、上記DNAと相補的なDNAもまた提供される。本発明によれば、上記DNAとそれに相補的なDNAが互いに相補的に結合して2重鎖DNAを形成していてもよい。

自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、DNAの構造及びそれから演繹されるペプチドの構造の一部を変異せしめることが可能であるから、本発明のDNAは前述のすべてのペプチドの相同変異体に相当する構造を有するペプチドをコードする塩基

配列を含有するものも可能である。

遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子から生産されるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子の塩基配列の少なくとも1つの塩基を他の種類の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAはまた、遺伝暗号の縮重に基づく置換によって変化された塩基配列を含有することも可能である。この場合、上記置換により得られた塩基配列から演繹されるアミノ酸配列は前に定義したアミノ酸配列と一致する。

更にまた、本発明によれば、前記の本発明のデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターとからなる複製可能な組換え体DNAが提供される。該組換え体DNAは、それによって形質転換された微生物または細胞中で、本発明のペプチドを発現することができる。適したベクターの例としてはプラスミドpBR322、pBR327、YRp7、YEp24 (ATCC 37051)、pSV2-dhfr(ATCC 37146)、pBPV-1(9-1) (ATCC 37111)などが挙げられる。尚、発現ベクターは宿主として使用する微生物または細胞に適し

たものを選択する必要がある。

更に本発明はまた、上述の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞に関する。微生物の例としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えばイー・コリ (*E. coli*) K12株294 (ATCC 31446)、イー・コリ (*E. coli*) B、イー・コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC 31537)、イー・コリ (*E. coli*) C600 およびイー・コリ (*E. coli*) C600 hfr 並びにイー・コリ (*E. coli*) W3110 (F⁻、λ⁻、プロトロフィック、ATCC 27375)；バチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) の如きバチラス (*Bacillus*) の属の菌株；サルモネラ・チフイムリウム (*Salmonella typhimurium*) またはセラチアマーセサンス (*Serratia marcesans*) 等の大腸菌以外の腸内菌；シュードモーナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株；およびサツカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などが挙げられる。細胞の例としては、VERO (ATCC CCL-81) 細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細

胞株、W138、BHK、COS-7 およびMDCK細胞株等の動物細胞が挙げられる。

更に本発明の他の態様によれば、

- (a) 前述のペプチドをコードするデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターに連結して該デオキシリボ核酸と該複製可能な発現ベクターとかなる複製可能な組換え体DNAを得、
- (b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物または細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、
- (c) 該形質転換体を該微生物または細胞の親細胞から選別し、
- (d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該デオキシリボ核酸を発現させて該ペプチドを産生せしめ、そして
- (e) 該ペプチドを培養した形質転換体から単離することを含む本発明のペプチドの製造方法が提供される。

本発明の方法によれば、前述の本発明のDNAが正しく転写し、それによって得られるmRNAからの翻訳が正しく行われるように本発明のDNAを

複製可能な発現ベクターのプロモーターなどのDNA領域の下流に組入れて該DNAを有する複製可能な組換え体DNAを得、得られた該組換え体DNAで微生物または細胞を形質転換させて該組換え体DNAを含有する形質転換体を得る。得られた形質転換体は、該組換え体DNAに与えられた表現型によって微生物または培養細胞の親細胞から単離される。得られた形質転換体を培養して前記デオキシリボ核酸の有する遺伝情報を発現させて本発明のペプチドを製造する。

尚、本発明のDNA及び組換え体DNAを構築するためには必要なDNA配列、例えばプロモーターや複製起源等をクローニングするためには原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系を使用するのが好ましい。原核細胞の例としてはエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えばイー・コリ (*E. coli*) K12株294 (ATCC 31446)、イー・コリ (*E. coli*) B、イー・コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC 31537)、イー・コリ (*E. coli*) C600 およびイー・コリ (*E. coli*) C600 hfr

並びにイー・コリ(E. coli) K 3110 (F⁻、λ⁻、プロトロフィック、ATCC 27375);バチラス サブチリス (Bacillus subtilis) の如きバチラス (Bacillus) の属の菌株;サルモネラ チフィムリウム (Salmonella typhimurium) またはセラチアマーセサンス (Serratia marcescens) 等の大腸菌以外の腸内細菌;シュードモーナス (Pseudomonas) 属の種々の菌株;およびサツカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) などが挙げられる。これらの細胞のうちエシエリヒア コリ(E. coli) K12株294 が最も好ましい。上記微生物を宿主として使用する場合、これら微生物に通したプラスミドベクターが組換え体DNAの複型可能な発現ベクターとして一般に用いられる。例えば大腸菌を形質転換するためのプラスミドベクターとしてはプラスミドpBR322やpBR327などを用いることができる。プラスミドベクターは通常複型起源、プロモーター、および組換え体DNAで形質転換した細胞を選別するのに有用な表現型を組換え体DNAに与えるマーカー遺伝子等を含んでいる。

例えば、本発明で用いることのできるプロモーターはアデノウイルス2、ポリオーマウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) などから得ることができる。特に、アデノウイルス2の主後期プロモーターやSV40の初期および後期プロモーターが好ましい。また、トロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有するヒト肺由来のペプチドをコードする遺伝子の上流の位置に本来存在するプロモーターも、上述の宿主-ベクター系で使用するのに適しているならば使用することができる。

複型起源については、外来性の起源、例えば、アデノウイルス、ポリオーマ、SV40、水痘性口内炎ウイルス (VSV)、ウシ乳頭腫ウイルス (BPV) 等のウイルス由来の複型起源を用いることができる。また、発現ベクターとして宿主染色体に組み込まれるような性質を有するベクターを用いる場合、宿主染色体の複型起源を利用することができる。

本発明の複型可能な組換え体DNAで形質転換

プロモーターの例としては、β-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター、トリプトファンプロモーター等が挙げられる。マーカー遺伝子の例としては、アンビシリン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子が挙げられる。一方、本発明のDNAを発現して本発明のペプチドを製造するためには上記の原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系および脊椎動物の細胞などの真核生物の細胞を宿主細胞として用いる宿主-ベクター系を使用することができる。真核細胞の例としては前述の動物の細胞株などの細胞が挙げられる。本発明のDNAを前述の真核細胞で発現させるために、本発明の組換え体DNAは一般に遺伝子発現を制御するための機能配列、例えば、複型起源、本発明のDNAの上流に位置すべきプロモーター、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位や転写終止配列を含有している。本発明のDNAを真核細胞内で発現させるのに用いることができるそのような機能配列はウイルスやウイルス性物質から得ることができる。

された微生物または細胞は、前述のとおり、組換え体DNAに与えられた少なくとも1種の表現型によって形質転換されずに残った親細胞から選別される。表現型は少なくとも1種のマーカー遺伝子を組換え体DNAに挿入することによって与えることができる。また、複型可能な発現ベクターが本来有しているマーカー遺伝子を利用することもできる。マーカー遺伝子の例としては、例えば、ネオマイシン耐性などの薬剤耐性遺伝子やジヒドロ葉酸レダクターゼ (以下 "DHFR" と称する) をコードする遺伝子などが挙げられる。これに関し、DHFR遺伝子をマーカー遺伝子として用いる場合、DHFRには種々のタイプがあるため、その使用するマーカー遺伝子のコードしているDHFRのタイプによって用いるべき宿主を選択しなければならない。例えば、マーカー遺伝子として野生型DHFRをコードする遺伝子を用いる場合、宿主としてはDHFR欠損株を用いるのが好ましい。DHFR欠損株はヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求するので、ヒポキサンチン、グリ

シンおよびチミジンを含まない培地中では成育できない。しかしながら、DHFR欠損株をDHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると、その株はもはやヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを要求しなくなり、ヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを含まない培地中でも成育することができる。従って、形質転換細胞は、ヒボキサンチン、グリシン及びチミジンについての栄養要求性を判断基準にして形質転換されないで残った細胞から容易に選択することができる。

一方、メトトレキセート(MTX)に対する親和性の低い変異体DHFRをコードする遺伝子(以下“MTX耐性DHFR遺伝子”と称する)をマーカー遺伝子として用いる場合には、宿主細胞は正常なDHFRをコードする遺伝子を有していてもよくDHFRを欠損している必要はない。その理由は以下のとおりである。正常DHFRはMTXによって阻害されるため、正常DHFRをコードする遺伝子を含有する宿主細胞はMTXの存在下ではヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを要求する。

酵母細胞用の発現ベクターのプロモーターの例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼまたはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェトイソメラーゼ、グルコキナーゼなどの解糖系に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する酵素、ガラクトース、マルトース及びラクトースの利用に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのうち、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する酵素類、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、及びガラクトース、マルトース及びラクトースの利用に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターは、これらのプロモーターによる転写を宿主の培養条件を変えることによ

り、ジンを要求する。しかしながら、その宿主細胞がMTX耐性DHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると形質転換細胞はMTX存在下においてもヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを要求しない。従って、形質転換細胞は、MTX存在下におけるヒボキサンチン、グリシン及びチミジンについての栄養要求性を判断基準として用いて形質転換されていない細胞から選択することができる。これに関し、真核細胞の大多数がMTX感受性であるのでMTX耐性DHFR遺伝子はマーカー遺伝子として用いるのに好都合である。

サツカロミセスセレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの酵母も本発明のDNAを発現するための宿主として用いることができる。酵母で本発明のDNAを発現するためには複製可能な発現ベクターとして例えばプラスミドYPEp24を用いることができる。プラスミドYPEp24はUra3遺伝子を含有しており、このUra3遺伝子をマーカー遺伝子として利用することができ

よって制御することができるので有利である。

酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複製起源や終止コドンおよびその他のDNA配列としては、酵母細胞に適している通常の公知のDNA配列を用いることができる。

形質転換した微生物または細胞は通常の栄養培地を用いて通常の公知の方法で培養することにより本発明のペプチドをコードするDNAを発現して本発明のペプチドを製造することができる。培養後、本発明のペプチドは形質転換体の培養物から通常の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィーなど用いて単離することができる。

このようにして得られたペプチドは様々な種類と長さの糖鎖を少なくとも1種含有していてよい。得られたペプチドが糖鎖を含有しているか否かは用いる宿主細胞の種類によって異なる。また、ペプチドが糖鎖を含有している場合の糖鎖の種類や長さも用いる宿主細胞の種類によって異なる。

一般に翻訳開始シグナルのATGから翻訳されたペプチドは宿主細胞から分泌されるときにプロ

セツシングを受けて~~する~~蛋白になることが知られている。本発明のペプチドの場合もそのようなプロセツシングを受けることがある。ペプチドがプロセツシングを受ける部位は、宿主により、または培養条件により変化する場合がある。例えば、本発明のペプチドが、式(1)で表されるペプチドとリーダー配列とを含むプロセツシングを受けていない未成熟形で形質転換細胞中で產生される場合、その未成熟形ペプチドはプロセツシングを受けてリーダー配列が削除されて成熟形となることがある。しかしながら、前述のように未成熟形ペプチドのプロセツシングを受ける位置は使用する宿主の種類や宿主の培養条件により変化するので必ずしも上記のようなプロセツシングが起きるとは限らない。

前述のとおり、本発明のペプチドは組換えDNA技術を用いる方法により製造することができる。また、本発明のペプチドは通常の公知の方法により、例えば市販の自動ペプチド合成装置などを用いて有機合成により製造することもできる。

固定候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いることができる。本発明のペプチドを上記の疾患の治療に用いる際には薬剤として使用可能な担体と混合することができる。即ち、上記の疾患を治療または予防するのに有効な量の本発明のペプチドを適当な量の担体と混ぜて、患者に効果的に投与するのに適した医薬組成物を調製することができる。本発明のペプチドは注射剤等として用いることができる。注射剤として用いる場合は、ショ糖、グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの増粘剤、各種無機塩のpH調整剤などを添加剤として加えることができる。

本発明の生理活性物質の成人1回当たりの投与量は年齢、性別、体重、症状等により異なるが、一般に約0.1~200mgであり、一日当たり一回または必要に応じて数回投与する。

本発明をより詳細に記述するために参考例及び実施例により説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例にのみ限定されるものではない。

本発明のペプチドはトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する。プロテインCは血液凝固凝溶機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化される。活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系補酵素の活性型第V因子、および活性型第Ⅺ因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノーゲンアクチベーターの产生に関与していることが知られている。

(鈴木宏治、医学の歩み、第125巻、901頁、(1983年))。本発明のペプチドは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテインCを大量に产生せしめるものである。従って、本発明のペプチドは生体における抗血液凝固及び血栓溶解に大きく寄与するものである。

前述のように、本発明のペプチドは抗血液凝固作用と血小板凝集抑制作用及び血栓溶解作用を有するので例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝

【参考例】

参考例1

(プロテインC活性化を促進する作用の測定)

本発明のペプチドのプロテインC活性化の促進作用の測定は、合成基質、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (Boc及びMCAはそれぞれL-ブトキシカルボニル基及び4-メチルクマリル-7-アミドの略称である)を用いる公知のプロテインC測定法(ワイ・オーノ(Y.Ohno)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.)、90巻、1387頁(1981年))に従って行なった。すなわち、0.5μMのプロテインCおよび8.0nMトロンビンを含有する水溶液5μL(0~0.01M280/nM)を加え、これにNaCl、CaCl₂、血清アルブミン及びトリス塩酸緩衝液(pH7.4)をそれぞれ最終濃度が0.15M、2.5mM、1mg/nM及び2.0nMになるように、そして全量が30μLとなるように加えた。得られた混合物を37℃で15分間反応させてプロテインCを活性化した後に2μMのアンチトロンビンⅢ

を $10 \mu\text{L}$ 及び $1 \mu\text{L}$ 単位 / ml のヘパリンを含有する水溶液を $10 \mu\text{L}$ 加えて 37°C で 15 分間加温して反応を停止させた。得られた反応混合物に、前述の合成基質 Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (財團法人蛋白質研究奨励会ペプチド研究会 (Peptide Institute) (日本) 製) $200 \mu\text{M}$ を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.4$) $250 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で 10 分間反応させた後、 20% 酢酸 0.5ml を加えて反応を停止させ、遊離してきた AMC (7-アミノ-7-メチルクマリン) の濃度を励起波長 380nm 、発光波長 440nm で蛍光分光光度計 RF-540 型 (島津製作所製、日本) により測定した。得られた蛍光強度を既知濃度の AMC の蛍光強度と比較して、遊離した AMC 量を求めた。値は 1 分間当たりに生成する AMC 量で表わす。この AMC 量から本発明のペプチドを含まない水溶液を加えたときの AMC 量を引いた値がサンプルのトロンビンによるプロテイン C 活性化を促進する強さを示す。

ここで、プロテイン C はヒト血しょうから鈴木

らの方法 (鈴木 (Suzuki) ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、258 卷、1914 頁、(1983 年)) で精製した。

また、ヒトトロンビンはランドブラッド (Lundblad) らの方法 (ランドブラッド (Lundblad) ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、66 卷、482 頁、(1975 年)) で精製した。

参考例 2

(プラスミド M13-TMD5 の構築)

本発明の原料となる DNA 断片 TMD5 を組み込んだプラスミド M13-TMD5 を本発明者によって既に出願され公開されている方法 (国際公開番号 WO88/05053 (国際出願番号 PCT/JP88/00011)) に従って作成した。

すなわち、トロンビンによるプロテイン C 活性化を促進するペプチドをコードするプラスミド、pSV2TMJ2 を取得し、該 DNA から部位特異的変異の手法を用いて DNA 断片、TMD5 を含む組換

え体プラスミド M13-TMD5 を得た。

なお、上記のプラスミド pSV2TMJ2 は、すでに本発明者によってアダベスト条約の規定に基き、アメリカ タイプ カルチャーレコレクション (ATCC) に寄託番号第 67283 号として寄託されている。

(実施例)

II) プラスミド pSV2TMJ6 の構築

(a) DNA 断片 TMD6 の構築

削除用 DNA プローブ (以降「デイリーター (deleter)」と称す) として、下記の塩基配列を有する DNA を有親合成した。

5' -GCACGGGTCCACGGGGAACCCCCAGG-3' (25mer) .

(この合成デイリーターを TMDs と称する。)

このようにして作成したデイリーター-TMDs を用いて、メソッド イン エンザイモロジー (Method in Enzymology)、第 100 卷、468 頁、(1983 年)、アカデミック プレス (Academic Press) に記載の方法に従って部位特異的変異の手法で前記の如く得られた組換え体プラスミド

M-13TMDS の 9 塩基からなる部分の削除を行った。すなわち、 25 pmol のデイリーター-TMDs 及び 10 pmol の M13 プライマー-M3 (ユニバーサルプライマー、宝酒造株式会社製、カタログ番号 3831) の 5' 末端を T_{4} キナーゼを用いてリン酸化した後、 0.5 pmol の組換え体プラスミド M13TMDS のシングルストランド DNA を加え、 95°C で 5 分間加熱後、室温にまで冷却した。次いで 5 単位の *E. coli* DNA ポリメラーゼ 1 (Klenow Fragment)、及び 10 単位の *T*₄ DNA リガーゼを混合物に加えて 37°C で 30 分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得られた混合物を大腸菌 (*E. coli*) JM105 (ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号 27-1550) に加えた。それによってこの大腸菌を組換え体プラスミドでトランスフェクションした。 37°C で一夜培養して生じた寒天培地上のブラークをニトロセルロースフィルターに移しとり、 80°C で 2 時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションは $6 \times \text{SSC}$

(0.9 M NaCl、180 mM Tris緩衝液(pH 8.0)、6 mM EDTA)、5×Denharts' (0.1 % (w/v) フィコール(Ficoll)、0.1 % (w/v) ポリビニルビロリドン、0.1 % (w/v)、ウシ血清アルブミン(BSA))、0.1 % SDS、100 μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中で55℃、2時間加温することにより実施した。次いで上記の溶液中の変性サケ精子DNAのかわりに³²PでラベルしたTMD₆を加えた溶液を用いてハイブリダイゼーション反応を55℃、2時間実施した。次いで、6×SSC (0.9M 食塩、0.09M クエン酸三ナトリウムの水溶液)を用いてニトロセルロースフィルターを洗浄した。洗浄は室温で、5分間、2回洗った後、55℃、65℃、75℃、と段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムXAR-5(イーストマン コダツク社製、米国)をニトロセルロースフィルターに密着させて-80℃、一夜露出させたところ、X線フィルム上に強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各スポットは組換え体プラスミドで

感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解析、及び塩基配列の解析を行ったところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは制限部位と塩基配列がそれぞれ同一であることがわかった。得られた組換え体プラスミドをM13-TMD6と称した。更にこの組換え体プラスミドM13-TMD6は、開始コドン(ATG)とその下流に115個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を含有するDNA断片を有することがわかった。この組換え体プラスミドM13-TMD6に含まれるDNA断片をTMD6と称した。第1図に組換え体プラスミドM13-TMD5とディリーター-TMD₆とがハイブリダイズし、DNA断片TMD6に応するDNA領域の一部が削除されたところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD6の構築

実施例(1)-(4)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD6をBind III およびBam HIで完全消化して

TMD6の約730bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をBind III およびBgl IIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD6とをT. DNAリガーゼを用いて組みあわせ、プラスミドpSV2TMD6を得た。

(2) プラスミドpSV2TMD6によるCOS-1細胞の形質転換

COS-1細胞(ATCC CRL1650)を培養器に入れ、10% (v/v) のウシ胎児血清(以下“FCS”と略す)を加えたグルベツコの最小必須培地(以下“MEM”と略す) (米国、フローラボラトリ(Flow Laboratories)社製、カタログ番号10-331)を用いて、37℃で5%炭酸ガスインキュベーター中にて対数増殖期になるまで培養し、0.1%トリプシン及び0.02%EDTAを用いて培養器に付着増殖した細胞を培養器よりはがして、ハンクス平衡塩類溶液(米国、フローラボラトリ(Flow Laboratories)社製、カタログ番号17-101-22)に約1×10⁷個/mlの濃度になるように懸濁した。

実施例(1)-(4)で得られたプラスミドpSV2TMD6を

約2 μg/μlになるように1mM Tris塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。約10 μgのプラスミドpSV2TMD6を含む得られたプラスミド懸濁液5 μlを1.5 ml容量のエッペンドルフ型試験管に入れ、次いでこの試験管に上述の如く得られたCOS-1細胞の細胞懸濁液200 μlを入れて0℃で10分間放置した。試験管内の懸濁液を米国 D.E.P. SYSTEM 社製細胞融合装置PPH1001型のキュベットに移し、1.2kVで40秒の条件で2回電気パルスを与えた。その後懸濁液を再び元のエッペンドルフ型試験管に移し、0℃で5分間放置した後、10% (v/v) FCSを加えたグルベツコのMEM 10mlを以下のように用いて直径10cmの組織培養用プレートに移した。即ち、少量の10% (v/v) FCSを含むグルベツコのMEMを懸濁液に加えてその混合物を組織培養用プレートに移した。次いで、試験管を残りのグルベツコのMEMで数回洗浄して洗浄液を同じプレートに加えた。その後、プレートは5%CO₂存在下37℃で24時間培養した。

(d) トロンビンによるプロテインC活性化を促進

する作用の確認

培養終了後、プレートの培地をFCSを含まないダルベツコのMEMに交換し、48時間培養した。培養上澄液を5μl採取し、これを試料として参考例1に記載した方法で、プロテインC活性化の促進作用を測定した。

更に、直径10cmの組織培養用プレート1枚分の細胞を米国コースター(Coaster)社製セルスクレイパー(Cell Scraper) (カタログ番号3010)を用いて搔き取って集め、800rpm、10分間の条件で遠心分離して集める。このペレットを試料として用いて参考例1に記載した方法でプロテインCの活性化を促進する作用を測定した。またコントロールとしてはプラスミドpSV2-dhfrでトランスフォームしたCOS-1細胞の培養上澄液及び細胞ペレットを試料として用いた。

結果を第1表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

以下 余白

プラスミド	試 料	吸光度
pSV2TMD6	培養上澄液	4400
(本発明)	細胞ペレット	7.0
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

(4) プラスミドpSV2TMD6によるCHO細胞の形質転換と形質転換細胞における発現

約4μgのプラスミドpSV2-neo(ATCC 37150)、及び約20μgの実施例1-10で作成したプラスミドpSV2TMD6を混合してエタノール沈殿をした。沈殿物を風乾燥後、450μlのTE(pH7.9、1mMトリス塩酸緩衝液、0.1mM EDTA)に溶解し、500μlの2×BBS(50mM HEPES、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄、pH7.12)を加えた。次いで50μlの2.5M CaCl₂を滴下し室温に10分間放置した。一方、10% (v/v) FCS及び、v/v 5% ベニシリーンストレプトマイシン(米国、フローラボラトリーソ製、カ

タログ番号16-700-49)を含有するHam's F-12培地(米国、フローラボラトリーソ製、カタログ番号10-421-20)を用いて直径6cmの組織培養用プレートにプレート1枚当たり細胞数5×10⁵程度播種したCHO-K1株(ATCC CCLD 61)を1夜培養し、培地を新鮮な培地に交換し、更に3時間培養した。このCHO-K1に前述のCaCl₂を滴下したプラスミドDNA溶液を重層し、37℃で約8時間培養した。5mLのPBS(-)(米国、フローラボラトリーソ製、カタログ番号28-103-05)を用いて2回洗浄し、さらに、5mLの前述の培地で洗浄後、新鮮な培地を加えて約16時間さらに培養した。

プレートに付着した細胞を0.25%トリプシン、0.02%EDTA溶液を用いてはがし、直径10cmの組織培養用プレート4枚に広げて培養した。24時間後、培地を選択培地に交換した。選択培地の組成は前述の培地に400μg/mLになる様にジエヌテイシン6-418(米国GIBCO社製、カタログ番号860-1811)を添加したものである。3~4日おきに培地交換を行いながら約2週間培養して、トランスフォー

ムした細胞をクローニングした。この操作で得られた細胞のクローンをそれぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。途中、培地のFCS濃度を10%から1%に減らした培地に切り換えて培養した。このFCS含有選択培地で培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化を促進する作用を測定したところ、強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

(5) プラスミドpdBPTMD-6-1によるC127細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定

実施例1-10で作成したプラスミドpSV2TMD6をHind IIIで完全消化した後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T₄DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD6のHind IIIサイトを

消失したプラスミド pSV2TMD6-1を得た。次いでこのプラスミド pSV2TMD6-1を Pvu II 及び Bam HI で完全消化して約1700bpのDNA断片を得た。これをプラスミド pUC18 の Hinc II 及び Bam HI で完全消化したベクターに挿入してプラスミド pUCTM6-1を得た。一方、プラスミド pBR322(ATCC 37017)からコバスルビアスらの方法(エル・コバスルビアスら(L. Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に従ってプラスミド pBR327を作製した。得られたプラスミド pBR327を Bam HI 及び Hind III で消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミド pUCTM6-1を Bam HI 及び Hind III で完全消化して得た約2600bpのDNA断片を挿入してプラスミド pBRTM6-1を得た。このプラスミド pBRTM6-1を Hind III で完全消化したものとプラスミド pBPV-1(9-1)(ATCC 37111)を Hind III で完全消化して得た断片とをT₁DNAリガーゼを用いて組いで、C₁₂₂細胞発現用のプラスミド pBPVTMD6-1を得た。以上の工程を第2図に示す。

次に実施例(4)に記載の方法に準じて pBPVTMD6-1

でC127細胞(ATCC CRL1616)をトランスフォームした。10%FCS 及び 1v/v %ペニシリントレプトマイシン(米国、フローラボラトリーカ型、カタログ番号16-700-49)を含むダルベツコのMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が5個得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地をFCSを含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミド pBPV-1(9-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

(6) プラスミド pYGa L1 TMD6-Yの構築

(a) 酵母発現用プラスミドベクター pYGa L1 の構築

Ga L1 プロモーターを持ったプラスミド pG1(ATCC37305)を Bam HI で完全消化した後、切

断末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、次いで Hind III を用いて完全消化して、Ga L1 プロモーターを含む約900bp断片を単離した。一方、M13ベクターのM13tg130(アマーシヤム・ジャパン製、コード番号RPN4537)を Hind III 及び Eco RV で完全消化して大きな断片を単離する。得られた断片と前述の約900bp断片とをT₁DNAリガーゼを用いて組ぎ、M13tg130-pG1を得た。

また、Trp5ターミネーターを持ったプラスミド pTrp56(ATCC37306)を Eco RI、及び Kpn I で完全消化して、Trp5ターミネーターを含む約540bpの断片を単離した。また、プラスミド pIB120(インターナショナル・バイオテクノロジーズ・インク社製、カタログ番号33820)を Eco RI、及び Kpn I で完全消化して約4200bpの大きな断片を単離した。得られた断片と前述の約540bpの断片とをT₁DNAリガーゼを用いて組ぎ、pITrp5を得た。

次いで、このpITrp5を Eco RI 及び Bam HI で完全消化して約500bpの断片を単離した。一

方、プラスミド YEP24(ATCC37051)を Pvu II で完全消化後、T₁DNAリガーゼを用いて Bam HI リンカー(アマーシヤム・ジャパン製コード番号DC8003)を組ぎ、さらに Bam HI で完全消化し、大きな断片を単離し、T₁DNAリガーゼを用いて切断末端を組ぎ合わせ、プラスミド YEP25を得た。次いで、YEP25を Sma I で完全消化した後、切断末端に Pvu II リンカー(ニュー・イングランド・バイオラボ社製、カタログ番号1043)をT₁DNAリガーゼを用いて組ぎ、さらに Pvu II で完全消化後、大きなDNA断片を単離し、切断末端をT₁DNAリガーゼで組ぎ合わせ、プラスミド YEP26を得た。次いで、YEP26を Tth 111で完全消化後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、さらに Bam HI で完全消化して大きなDNA断片を単離した。

得られたDNA断片と前述のpITrp5を Eco RV 及び Bam HI で完全消化して得た約500bpの断片とをT₁DNAリガーゼを用いて組ぎ合わせ、YEP27を得た。さらに、得られたYEP27を Pvu II 及

び Bam H I で完全消化して大きなDNA断片を単離した。一方、前述のM13tg130-PG1を Bam H I 及び Sma I で消化して約 900bp の断片を単離し、次いで T-DNAリガーゼを用いて得られた約 900 bp の断片を YEP27 の Pvu II - Bam H I 断片と組み合わせ、酵母発現用ベクター-pYGA ε 1を得た。

以上の工程を第3図に示す。

(b) 酵母発現用DNA断片TMD6-Yの構築

実施例(1)-(a)で作成したM13-TMD6には開始コドン(ATG)の直後に開始コドンを含めて54塩基対より成るいわゆるリーダー配列があるので、この配列を実施例(1)-(a)に記載と同様の手法で部位特異的変異の手法で削除して酵母発現用DNA断片TMD6-Yを含む組換え体プラスミドM13-TMD6-Yを作成した。なお、ディリーターとして、TMD6-Yの命名した下記の塩基配列を有するDNAプローブを有機合成した。

5' -GCACGGCTCCACCATGTTACCCAGG-3' (25mer)

第4図に組換え体プラスミドM-13TMD6とディリーター-TMD6-Yとがバイブリダイズし、DNA断

片TMD6に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

(c) プラスミドpYGA ε 1-TMD6-Yの構築

実施例(6)-(b)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD6-Yを Hind III および Bam H I で完全消化してTMD6-Yを含むDNA断片を単離した。一方、実施例(6)-(a)で作製した酵母発現用プラスミドベクター-pYGA ε 1を Hind III 及び Bam H I で完全消化してベクターを得た。得られたベクターとDNA断片TMD6-YとをT-DNAリガーゼを用いて組み合わせ、プラスミドpYGA ε 1-TMD6-Yを得た。

(d) プラスミドpYGA ε 1-TMD6-Yによる酵母の形質転換と形質転換細胞における発現

サツカロマイセス・セレビシア (Saccharomyces Cerevisiae) SHY3 (ATCC44771) を 3 m1 のYPD 培地 (1 % バクト・イーストエキストラクト、 2 % バクト・ペプトン、 2 % デキストロース、 2 % バクト・アガ) で 30℃ で一夜振盪培養したものを 100 m1 のYPD 培地に移しかえ、 30℃ でさらに 5 時間振盪培養する。その培養液を 1 m1 とて遠心分離 10,000

r.p.m. (1 分間) して菌体を集め、さらにその菌体で 200 μ l の 0.2M LiCl ε に懸濁し、再び遠心分離 (10,000r.p.m., 1 分間) して菌体を洗う。1.5 m1 容量のポリエチレンチューブ内でこの洗浄菌体に 20 μ l の 1M LiCl ε 、 30 μ l の 70% ポリエチレングリコール 4000 、 10 μ l の 0.5 mg/m1 の実施例(6)-(c)で作成したプラスミドDNA、 pYGA ε 1-TMD6-Y をそれぞれ順次加えよく攪拌する。30℃ で 1 時間加温後、 42℃ 5 分間の熱処理後、イースト・ナイトロゲン・ベース (アミノ酸不含有) (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, DIFCO 社製、カタログ番号 0919-15) を 6.7 g/l 、及びグルコース 20 g/l にさらに SHY-3 の持っている栄養要求性のうちウラシルを除く栄養源を添加した寒天培地にブレーティングして 30℃ で加温する。

3 日後にこの培地に生育して来たコロニーが約 30 コロニー得られたのでそのうち、 6 コロニーを単離し、それぞれ培養し、制限酵素を用いた解析をした結果、 6 個のコロニーが全て、目的のプラスミド pYGA ε 1-TMD6-Y を含むものであることが判

明した。このうちの一株を 500 m1 のYPD 培地で 30℃ で一夜振盪培養したものを 4,000r.p.m.、 20 分間遠心分離して菌体を集め、ガラクトースを 2 % 含んだ SD 培地 (0.67% バクト・イースト・ナイトロゲン・ベース、アミノ酸不含有、 2 % デキストロース、 2 % バクト・アガ) 100 m1 に懸濁し、 30℃ で 4 時間振盪した。4,000r.p.m.、 20 分間の遠心分離で菌体を集め、温菌体重 10 g 当たり、 50 g のガラスビーズ及び 15 m1 の緩衝液 (0.1M リン酸ナトリウム、 pH 8.0) を加え、ブラウンのホモジナイザー (西独、ブラウン社製、タイプ 853022) を用いて 6 回、各 30 秒間ホモジナイズする。遠心分離して、上澄 10 μ l をとて参考例 1 に従ってプロテイン C 活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が検出された。また、コントロールとして用いた TMD6-Y の挿入されていないプラスミド pYGA ε 1 で形質転換された酵母では本活性は検出されなかった。

(e) 本発明のペプチドの精製

実施例(4)に記載した方法で培養したプラスミド

pSV2-neo及びプラスミドSV2TMD6でトランスフォームしたCHO細胞を直径10cmの組織培養用プレート25枚で培養した。培地は1日おきに4回、新鮮な培地と交換した。この培養液をすべて集め(約100ml)、pH7.5に調整した後DIP-トロンビン-アガロースのカラムクロマトグラフィーにかけて精製した。

すなわち、エヌ・エル・エスモン(N.L.Esson)ら(ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem)、257巻、859頁、(1982年))の方法にしたがって作製したDIP-トロンビン[ジイソプロピルホスホロトロンビン(diisopropylphosphorothrombin)]を、ピー・クオトレカサス(P.Cuatrecasas)の方法(ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem)、245巻、359頁、(1970年))にしたがってプロムシアン化したアガロースに結合させてDIP-トロンビン-アガロースを作製した。

次にDIP-トロンビン-アガロースを2.5cmφ

×10cmの大きさのカラムに充填してDIP-トロンビン-アガロースカラムを作製し室温で0.1M NaCl、0.5mM CaCl₂、1mMベンズアミジン塩酸、0.5% (v/v)Lubrol PX(半井化学薬品製、日本)を含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)でカラムを平衡化した。次いで、上記の上澄液をカラムに供した。カラムを0.3M NaCl、0.5mM CaCl₂、1mMベンズアミジン塩酸、0.5% (v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄した後、1M NaCl、0.1mM EDTA、1mMベンズアミジン塩酸0.5% (v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出して2.0mlずつフラクションを集めた。溶出によって得られる各フラクションについての前記の方法でプロテインC活性化の促進作用を測定した。同時に島津製作所(日本)製スペクトロフォトメーターUV-240を用いて各フラクションの波長280nmにおける吸光度(A₂₈₀)を測定した。活性のある部分を回収し、0.1M NaCl、0.5mM CaCl₂、0.5% (v/v)Lubrol PX(半井化学薬品製、日本)を含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)

で透析した。得られた透析液を2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。即ち、透析液を1.5cmφ×10cmの大きさのDIP-トロンビン-アガロースカラムに通し、0.4M NaCl、0.5mM CaCl₂、0.1% (v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、さらに0.4M NaCl、0.1mM EDTA、0.1% (v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄し、次いで、1M NaCl、0.5mM EDTA、0.1% (v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。活性部分を回収し精製品を-80°Cで凍結保存した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならない10.0(E_{1cm}^{1%}·280nm = 10.0)と規定して、それに

基づき精製品の量を計算したところ約5μgであった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5~10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバ

ンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

(9) トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用の確認

精製した本発明のペプチドのプロテインC活性化の促進作用を以下の方法にて評価した。

即ち、0.1M NaCl、0.5mM CaCl₂、10μg/mlウシ血清アルブミンを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に50μg/mlのプロテインC、5nMのトロンビンおよび5nMの精製した本発明のペプチドを加えて37°Cで反応させた。反応物に300μg/mlのアンチトロンビンIII(米国シグマ社製)および5nM EDTAを加えて反応を停止して、生成した活性型プロテインCの量を前述の合成基質を用いる方法で測定した。

結果を第5図に示すが、本発明のペプチドを無添加の場合(B)では活性化プロテインCの生成は認められなかった(点線)が、本発明のペプチドを添加した場合(A)には、反応時間と共に生成した活性化プロテインCの量が増加した(実線)。

(抗血液凝固作用の確認)

本発明のペプチドがトロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリソームへの変換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害することはハインリッヒ アーレンジング社(西独)製のコアギュロメーターKC-10を用いて血液凝固時間を測定することによって調べた。即ち、5mM CaCl₂、0.1M NaClを含む0.05Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に3.0 μgのフィブリノーゲン(米国シグマ社製、フラクションI)を加え、これに0-50nMの精製した本発明のペプチドを加え、次いで、全量が0.4 mlになるように10nMのトロンビンを加えて凝固時間を測定した。

結果を第6図に示す。トロンビンにくらべ、添加した精製ペプチドの量が多くなるにしたがって、血液凝固時間が延長されることが確認された。

(血小板凝集抑制作用の確認)

本発明のペプチドがトロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害することはSIENCO社(米国)製のプレートレットアグリゴメーターを用いて評価した。即ち、30万cell/μlの血小板溶液

(Platelet Rich Plasma、P.R.P.)250 μlに1単位のトロンビン(約0.4 μg)を加えると血小板が凝集するが、トロンビンを加える前にその加えたトロンビンと等モル以上の精製した本発明のペプチドを加えておくと血小板の凝集が起きなかつた。

(適用例)

以下に本発明のペプチドの適用例を適用例をもって説明するが、本発明はそれら適用例により何ら限定されるものではない。

適用例1

精製した本発明のペプチド	10mg
精製ゼラチン	20mg
マンニトール	100mg
塩化ナトリウム	7.8mg
リン酸ナトリウム	15.4mg

上記成分を注射用蒸留水2mlに溶解し、無菌バイアルに入れ、-35℃で2時間予備凍結し、-35℃で真空度0.075Torrで35時間一次乾燥し、次いで30℃、真空度0.03Torrで5時間二次乾燥して、

注射用バイアルを製造した。得られた組成物は、投与直前に生理食塩水もしくはブドウ糖注射液500mlに溶解して点滴静注するのに用いられる。

適用例2

精製した本発明のペプチド	2.5mg
アルブミン	5mg
マンニトール	25mg
塩化ナトリウム	1.95mg
リン酸ナトリウム	3.85mg

上記成分にて、適用例1と実質的に同様の方法により注射用バイアルを製造した。

(効果)

本発明のペプチドは、抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用、血栓溶解作用を合わせ持ち副作用の少ない循環器系疾患や妊娠中毒症などの治療用薬として極めて有用な物質である。また、本発明のペプチドは、このような医薬用途以外に、たとえば、人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用人工材料に結合させて、血栓の形成を防止する薬剤として用いることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は組換え体プラスミドM-13 TMD5とディリーターTMD_{5-Y}とが相補的にハイブリダイズした状態を示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第2図は、本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドpdBPVTMD6-1の構築を示すフローチャートである。

第3図は、本発明の複製可能な組換え体DNAの酵母発現用ベクターpYGe₁の構築を示すフローチャートである。

第4図は、組換え体プラスミドM-13 TMD6とディリーターTMD_{6-Y}とが相補的にハイブリダイズした状態を示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第5図は精製した本発明のペプチドの存在下及

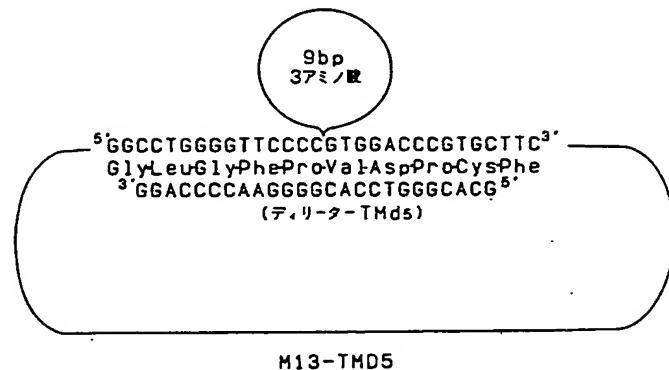
び非存在下における **テインC** と **トロンビン**との反応によって生成した活性化プロテインCの量と反応時間との関係を示すグラフである。

第6図は、精製した本発明のペプチドを添加した血液の凝固時間と精製した本発明のペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

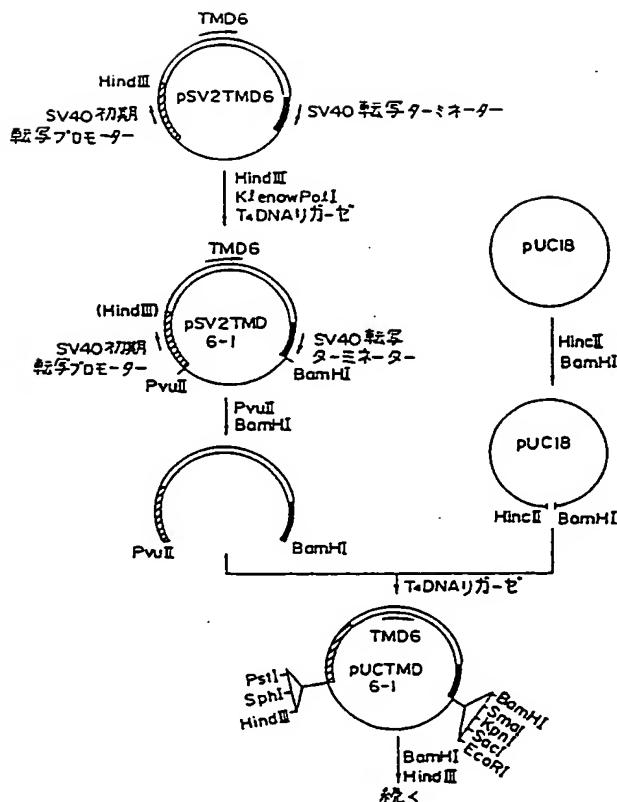
特許出願人 旭化成工業株式会社

代理人 井理士 荻 上 豊 規

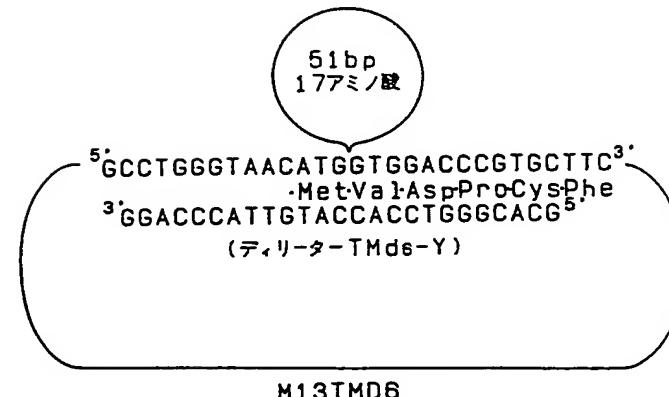
第1図



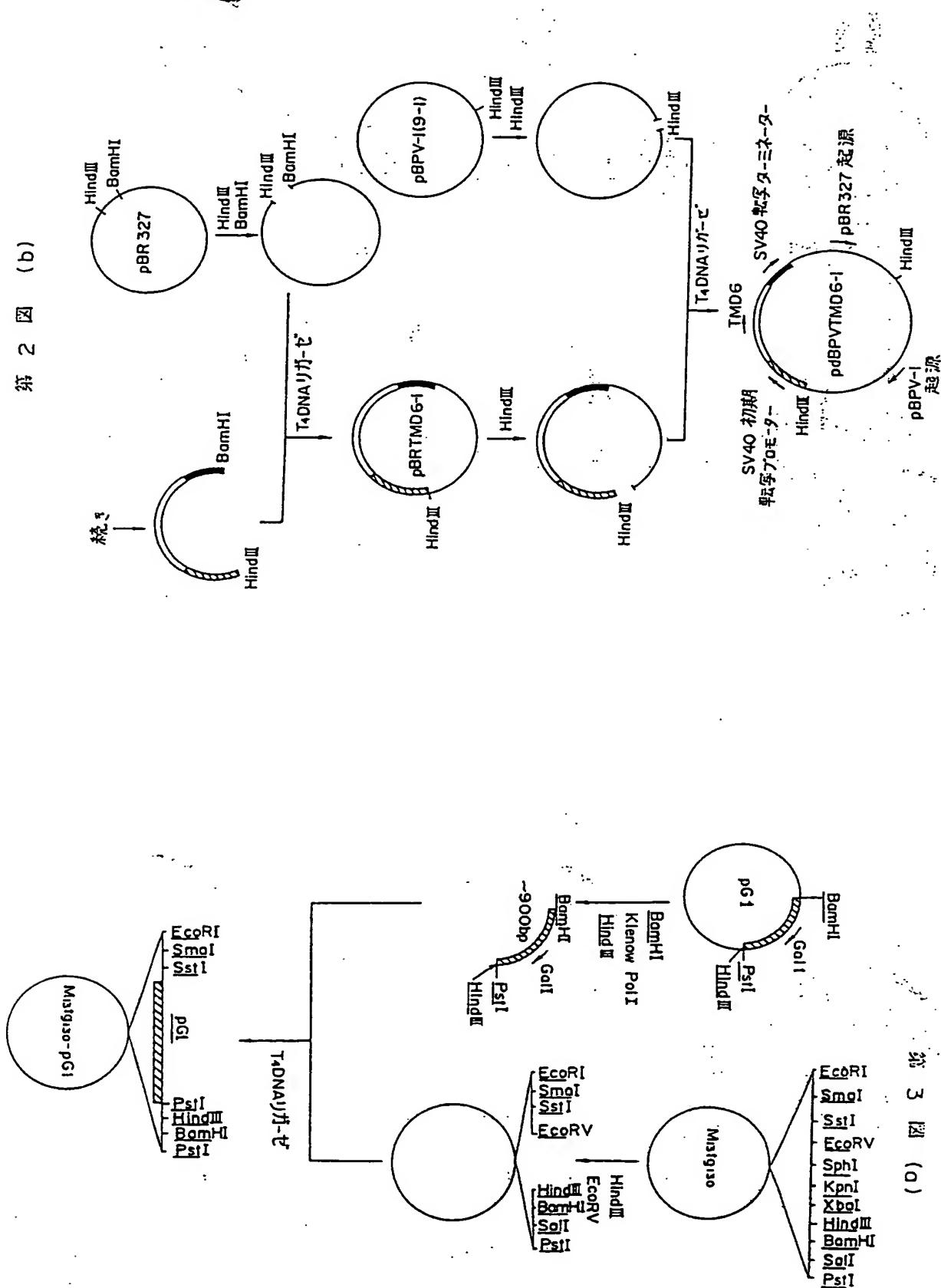
第2図 (a)



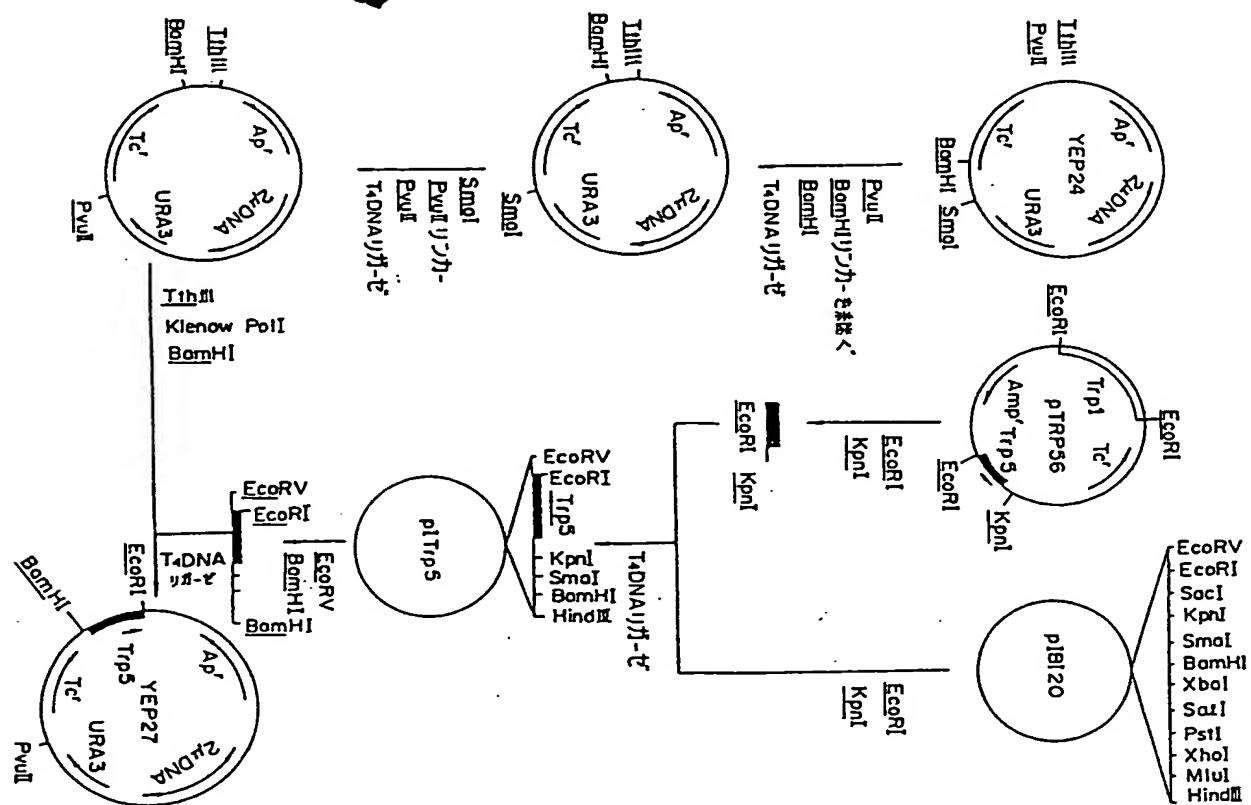
第4図



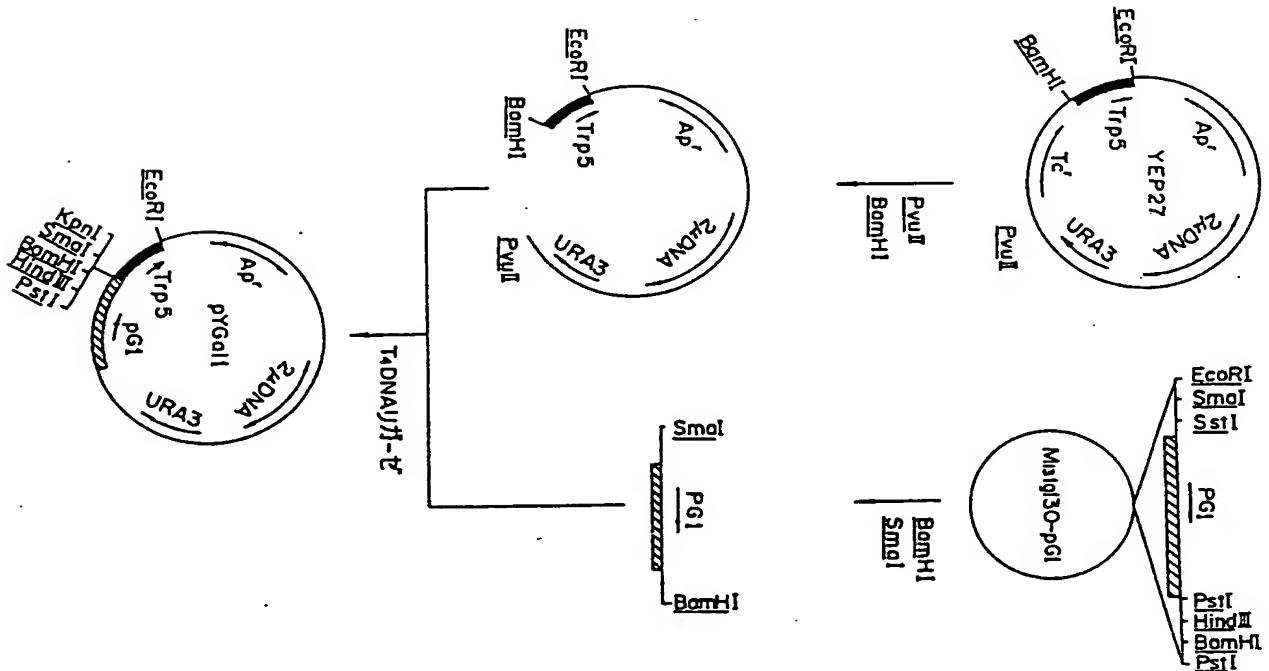
第2図 (b)



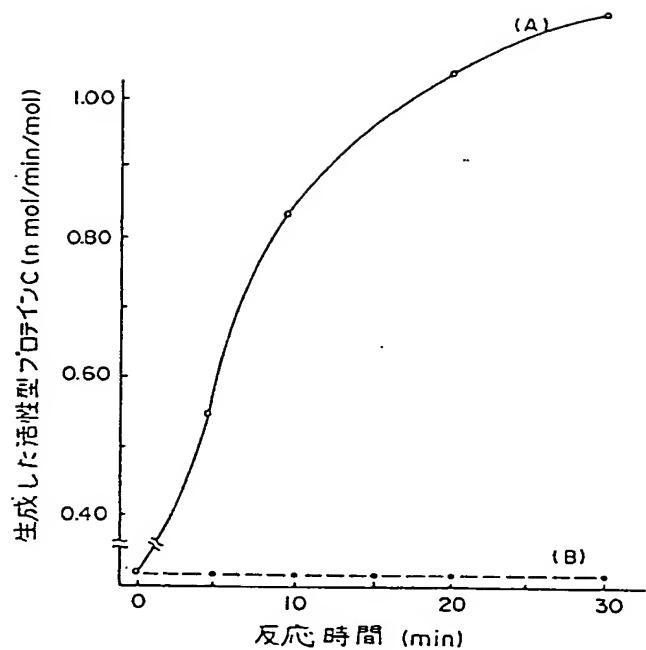
第3図(b)



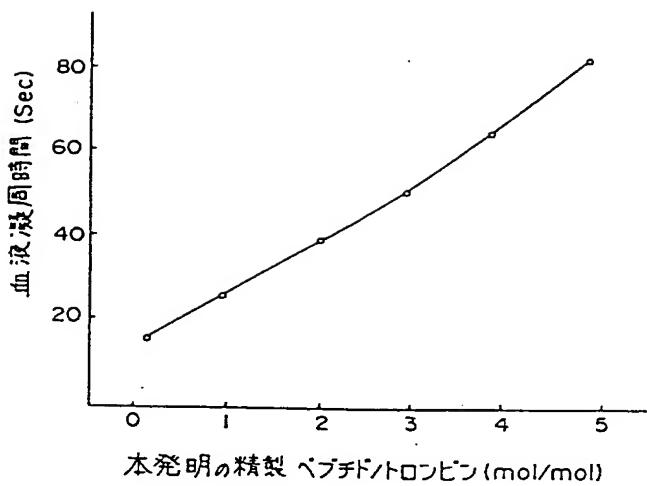
第3図(c)



第 5 図



第 6 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 21/02
 C 12 R 1:19)
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:91)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.